

Studien zum "Glucose-Effekt" in Hefe

*Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Medizinischen Doktorgrades
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Albert-Ludwigs-Universität zu Freiburg im Breisgau*

*vorgelegt von
Rainer Edelbert Kronau
aus Altstadt (Oberschlesien)*

1965

Aus dem Biochemischen Institut der Universität Freiburg i.Br.

Direktor: Professor Dr. Helmut HOLZER

STUDIEN ZUM "GLUCOSE-EFFEKT" IN HEFE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Medizinischen Doktorgrades
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Albert-Ludwigs-Universität zu Freiburg im Breisgau

vorgelegt von
Rainer Edelbert Kronau
aus Altstadt (Oberschlesien)

1965

Dekan: Professor Dr.med. Karl-Wilhelm KALKOFF

Referent: Professor Dr.rer.nat. Helmut HOLZER

Die vorliegenden Untersuchungen wurden in der Zeit vom 17. November 1963 bis 30. April 1965 im Biochemischen Institut der Universität Freiburg im Breisgau durchgeführt.

Herrn Professor Dr. Helmut HOLZER danke ich für die Überlassung des Themas und eines Arbeitsplatzes sowie für seine vielfältige Anregung und Förderung.

Fräulein Dr. Irene WITT , die mich mit den biochemischen Methoden vertraut machte und durch Beratung und verständnisvolle Unterstützung zu dieser Arbeit betrug, gilt mein besonderer Dank.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Meinen Eltern

UNIVERSITY OF LEEDS



INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
Liste der verwendeten Abkürzungen	11
A. EINLEITUNG	13
B. I. PRÄPARATE	17
B. II. METHODEN	19
1.) Verwendete Hefestämme	19
2.) Anzucht der Hefezellen	19
3.) Inkubation der Hefezellen	20
4.) Aufschluß der Hefezellen	21
5.) Messung des Wachstumsverlaufes der Hefezellen	22
6.) Messung der Enzym-Aktivitäten	23
7.) Manometrie	26
8.) Protein-Bestimmung	26
C. ERGEBNISSE	27
1.) Repression der Malatdehydrogenase	27
2.) Repression der Isocitratlyase und Malat- synthase	30
3.) Repression der Alkoholdehydrogenase	34
4.) Kinetik der Aktivitäts-Zunahme von Alko- holdehydrogenase und Malatdehydrogenase	37

	Seite
5.) Einfluß von Proflavin und Actinomycin	40
6.) Repression unter anaeroben Bedingungen	41
7.) Abhängigkeit der Repression der Malatdehydrogenase von der Glucose-Konzentration	41
8.) Zum Mechanismus der Repression durch Glucose	44
9.) Einfluß verschiedener C ₆ -Kohlenstoffverbindungen auf die Malatdehydrogenase-Synthese	55
10.) Repression durch 2-Dexoxyglucose und Glucosamin	56
11.) Abhängigkeit der Repression der Malatdehydrogenase von der 2-Desoxyglucose- und Glucosamin-Konzentration	58
12.) Einfluß von 2-Desoxyglucose und Glucosamin auf den Stoffwechsel der Hefezellen	61
D. DISKUSSION	65
1.) Repression nicht-induzierter Enzymsynthesen durch Glucose	65
2.) Bedeutung des "Glucose-Effektes" für den Stoffwechsel der Hefezelle	67
3.) Mögliche Gründe für die rasche Aktivitätsabnahme der Malatdehydrogenase nach Glucose-Zugabe	70
4.) Zur Frage des eigentlichen Repressors beim "Glucose-Effekt"	72

	Seite
E. ZUSAMMENFASSUNG	77
F. LITERATURVERZEICHNIS	79
LEBENS LAUF	83

Liste der verwendeten Abkürzungen

ADH	= Alkoholdehydrogenase
ADP	= Adenosindiphosphat
ATP	= Adenosintriphosphat
DPN	= Diphosphopyridinnucleotid oxydiert
DPNH	= Diphosphopyridinnucleotid reduziert
EDTA- Na_2H_2	= Äthylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz
G-6-PDH	= Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase
ICL	= Isocitratlyase
MDH	= Malatdehydrogenase
MS	= Malatsynthase
TPN	= Triphosphopyridinnucleotid oxydiert

A. Einleitung

Die reprimierende Wirkung der Glucose auf Enzymsynthesen ist seit 1942 durch die Versuche von EPPS und GALE (9) bekannt. Bis heute kennt man etwa 20 bis 30 Enzyme in Mikroorganismen, deren Synthese durch Glucose reprimiert wird (Tab. I).

Die Beobachtung von KOHLHAW (15), daß die spezifische Aktivität der Malatdehydrogenase (L-malate:NAD oxidoreductase, E.C. 1.1.1.37) in Hefezellen nach Inkubation mit Acetat wesentlich höher ist als nach Inkubation mit Glucose, gab die Veranlassung zu untersuchen, ob hier eine Repression der Enzymsynthese durch Glucose vorliegt. Die Ergebnisse dieser Versuche, die in der vorliegenden Arbeit dargestellt werden, bestätigen diese Annahme.

Zur Klärung der Frage, welche Bedeutung dieser "Glucose-Effekt" für die Hefezelle hat, wurde der Einfluß von Glucose auf Enzyme untersucht, die Reaktionen von Stoffwechselwegen katalysieren, an denen auch die durch Malatdehydrogenase katalysierte Reaktion beteiligt ist: Citronensäure-Cyclus und Glyoxalat-Cyclus. Dabei wurde gefunden, daß auch die Synthe-

Enzym	Organismus	Autor	
Aminosäure-Desaminasen	E. coli	EPPS u. GALE 1942	(9)
Invertase	Saccharomyces	DAVIES 1953	(4)
Histidase	A. aerogenes	MAGASANIK 1955	(24)
Tryptophanase	E. coli		
Lactase	Saccharomyces	DAVIES 1956	(5)
Glycerin-Dehydrogenase	A. aerogenes	NEIDHARDT u. MAGASA- NIK 1956	(34)
Inositol-Dehydrogenase	A. aerogenes		
Isocitratlyase	P. ovalis,	KORNBERG 1958	(17)
Malatsynthase	Saccharomyces		
	P. ovalis,		
	Saccharomyces		
β-Galactosidase	E. coli	HERZENBERG 1959	(12)
β-Glucosidase	Saccharomyces	MACQUILLAN, WINDER- MAN u. HALVORSON 1960	(23)
Isocitrat-Dehydrogenase	Saccharomyces	MACQUILLAN u. HAL- VORSON 1962	(22)
Succinat-Dehydrogenase	Saccharomyces		
Acetat-Kinase	E. coli	HALPERN, EVEN- SHOSHAN u. ARTMAN 1964	(10)
Fumarase	E. coli		
Isocitrat-Dehydrogenase	E. coli		
Malatdehydrogenase	E. coli		
Succinat-Dehydrogenase	E. coli	JACOBY 1964	(14)
Homogentisinat-Oxydase	P. fluoresc.		
p-Hydroxyphenylpyruvat- Hydroxylase	P. fluoresc.		
Urocanase	P. fluoresc.		
Isocitratlyase	Achromobacter	KORNBERG 1964	(18)
Cytochrom-C-Oxydase	Saccharomyces	POLAKIS, BARTLEY u. MEEK 1964	(37)
DPNH-Cytochrom-C-Oxy- doreductase	Saccharomyces		
DPNH-Oxydase	Saccharomyces	TUSTANOFF u. BARTLEY 1964	(43)
Cytochrom-C-Oxydase	Saccharomyces		
Isocitratlyase	Rh. nigricans	WEGENER u. ROMANO 1964	(44)
Malatdehydrogenase	Saccharomyces	WITT, KOHLHAW u. HOLZER 1964	(46)

Tab. I: Durch Glucose reprimierbare Enzyme in Mikroorganismen.

se von zwei weiteren Enzymen des Glyoxalat-Cyclus durch Glucose reprimiert wird: Isocitratlyase (L_s -isocitrate glyoxalate-lyase, E.C. 4.1.3.1) und Malatsynthase (L-malate glyoxalate-lyase, E.C. 4.1.3.2). Weiterhin wurde gefunden, daß auch die an der Gluconeogenese aus Äthanol beteiligte Alkoholdehydrogenase (Alcohol:NAD oxidoreductase, E.C. 1.1.1.1) reprimiert wird. Dadurch erhält die Enzymrepression durch Glucose eine entscheidende Bedeutung für die Regulation des Hefe-Stoffwechsels über verschiedene Stoffwechselwege.

Die umfangreiche Literatur über den "Glucose-Effekt" beschäftigt sich im wesentlichen mit dem Mechanismus der reprimierenden Wirkung der Glucose; dieser blieb aber bisher ungeklärt. Aber auch die Frage, ob Glucose selbst oder Abbauprodukte der Glucose für die reprimierende Wirkung verantwortlich sind, blieb offen. MAGASANIK (20, 25, 26, 31, 32, 35), MANDELSTAM (27, 28, 29, 30) und HALVORSON (11, 21, 22, 23) nehmen an, daß es sich um Katabolite oder Metabolite des Glucosestoffwechsels handelt.

Ungeklärt ist auch, ob alle durch Glucose reprimierbaren Enzyme durch den gleichen Glucosestoffwechsel-Metaboliten

reprimiert werden oder ob für die verschiedenen Enzyme spezifische Metabolite in Frage kommen.

Es wurden daher an den oben angeführten — durch Glucose reprimierbaren — Enzymen einige Versuche zum Mechanismus des "Glucose-Effektes" ausgeführt. Dabei wurde gefunden, daß die Wirkung der Glucose auf die Synthese der reprimierbaren Enzyme nicht in allen Fällen gleich ist. Darüber hinaus zeigten Versuche mit Glucose-Derivaten, daß für die in diesem System reprimierten Enzyme die reprimierende Substanz Glucose selbst oder Glucose-6-phosphat ist. — KORNBERG (18) hat für die Glucose-Repression in *E. coli* das Phosphoenolpyruvat als verantwortliche Substanz gefunden. Man kann vermuten, daß verschiedene Metabolite der Glucose reprimierend wirken können und bestimmte Enzymgruppen jeweils durch spezifische Substanzen reprimiert werden.

B. I. Präparate

Die in diesen Versuchen verwendeten Präparate hatten folgende Herkunft:

Die Biochemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von der Firma C. F. Boehringer u. Soehne GmbH, Mannheim, bezogen.

L-Äpfelsäure, 2-Desoxy-D-Glucose (Glucose-frei), D-Glucosaminhydrochlorid, Gluconsäure (Lacton), DL-Isocitronensäure (Lacton, allo-frei) Methyl-~~α~~-D-Glucopyranosid und Sorbitol (D-Glucitol) lieferte die Firma Calbiochem, Luzern, Schweiz.

Glyoxylsäure-Monohydrat, Natriumsalz, lieferte die Firma Sigma Chemical Comp., St. Louis, Mo., USA.

Aluminiumpulver: Alcoa Alumina, A-305, Bacteriological Grade, wurde von der Firma Aluminum Company of America, Pittsburgh, USA, bezogen.

Proflavin lieferte die Firma Nutritional Biochemicals Corp., Cleveland, Ohio, USA.

Actinomycin C stellte dankenswerterweise Herr Dr. AUHAGEN von der Firma Bayer, Leverkusen, zur Verfügung.

Alle übrigen Chemikalien waren p. a. -Substanzen der Firmen E. Merck A G, Darmstadt, und Riedel-de Haën AG, Seelze-Hannover.

Difco Yeast Extract, Difco Bacto-Peptide und Difco Bacto-Agar wurden von der Firma Difco Laboratories, Detroit, Mich., USA, bezogen.

B. II. Methoden

1.) Verwendete Hefestämme:

Für die Versuche wurden die Hefestämme *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*, Yeast Foam, und *Saccharomyces cerevisiae* "R 59" (Ephrussi) verwendet.⁺) Die Dauerkulturen dieser Stämme wurden auf festem Nähragar gehalten und jeweils monatlich auf frischen Nähragar überimpft. Dieser Nähragar bestand aus Difco Yeast Extract 1.0%, Difco Bacto-Peptide 2.0%, Difco Bacto-Agar 2.5% und D-Glucose-Monohydrat 2.0%.

Außerdem wurde Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae* der Firma Sinner AG, Karlsruhe) verwendet.

2.) Anzucht der Hefezellen:

Die Anzucht der Hefezellen erfolgte unter sterilen Bedingungen in einem Minimalmedium nach TAVLITZKI (42) mit Luft im Gasraum; dabei wurden die Kulturen bei 30° C maschinell geschüttelt.

⁺) Frau Dr. Ullrich-Greve (Forstbotanisches Institut der Universität Freiburg im Breisgau) danke ich für die Überlassung der Hefestämme.

Die Zellen wurden zunächst 20 Stdn. in einer Subkultur angezogen. Die Konzentration der Hefezellen in der Subkultur wurde durch Messung der Extinktion der Subkultur bei 578 nm und $d=1.0$ cm (Photometer "Eppendorf") ermittelt. Die Beimpfung des Hauptkultur-Mediums erfolgte mit soviel Subkultur, daß die Anfangskonzentration der Hefezellen in der Hauptkultur ungefähr einer Extinktion von 0.055 bei 578 nm und $d=1.0$ cm entsprach. Nach 7 Stdn. Wachstum in der Hauptkultur wurden die Hefezellen geerntet. Wie die Wachstumskurve (Abb. 5, S. 50) zeigt, erfolgte die Ernte am Ende der logarithmischen Wachstumsphase. Geerntet wurden die Hefezellen durch 10 Min. Zentrifugieren bei $3\,000 \times g$, zweimaliges Waschen des Sedimentes mit Aqua dest. und 10 Min. Zentrifugieren bei $34\,000 \times g$. Das erhaltene Sediment wird als Feuchtheefe bezeichnet.

3.) Inkubation der Hefezellen:

Es wurden jeweils 1.0 g Feuchtheefe bei 30°C unter Schütteln in 250 ml des folgenden Mediums in einem Fernbach-Kolben inkubiert:

$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,7 g, KH_2PO_4 nach Sörensen 1.0 g, NaCl 0.5 g, $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ 0.6 g, FeCl_3 1%ige Lösung 1.0 ml, Lösung "A" 10.0 ml, Lösung "B" 0.24 ml und Lösung "C" 0.024 ml wurden mit Citronensäure-Phosphat-Puffer (McIlvaine-Puffer) pH 5.0 (51.5 Vol. % Dinatriumhydrogenphosphat 0.2 M und 48.5 Vol. % Citronensäure 0.1 M) auf 100 ml aufgefüllt. Dieser Lösung wurden 1.4 g L-Asparaginsäure (in Aqua dest. gelöst und mit NaOH neutralisiert) zugesetzt. Anschließend wurde mit Aqua dest. auf 1 000 ml aufgefüllt.

(Lösung "A": β -Alanin 20 mg, L-Leucin 10 mg und m-Inosit 50 mg wurden auf 100 ml mit Aqua dest. aufgefüllt. Lösung "B": Pyridoxinhydrochlorid 8 mg, Thiaminhydrochlorid 8 mg und Calcium-D-Pantothenat 1.2 mg wurden mit Aqua dest. auf 50 ml aufgefüllt. Lösung "C": D-Biotin 0.4 mg wurden mit Aqua dest. auf 50 ml aufgefüllt.)

Die den Ansätzen zugesetzten Kohlenstoff-Quellen und die Dauer der Inkubation sind jeweils bei den Versuchen angegeben.

4.) Aufschluß der Hefezellen:

Nach der Inkubation wurden die Ansätze 10 Min. bei 3 000 x g zentrifugiert, die Sedimente zweimal mit Aqua dest. ge-

waschen und nochmals 10 Min. bei 34 000 x g zentrifugiert. Jeweils 500 mg der Sedimente wurden mit 1.5 g Alcoa-Pulver 5 Min. in einem vorgekühlten Porzellanmörser zerrieben. Anschließend wurde mit 3.0 ml eisgekühltem 0.1 M Phosphat-Puffer nach Sörensen pH 6.0 extrahiert und 20 bis 30 Min. bei 34 000 x g und 0° C zentrifugiert. Im Überstand wurden die Enzym-Aktivitäten bestimmt.

Etwas abweichend von diesem Schema wurde in denjenigen Versuchen verfahren, wo die spezifische Aktivität vor und nach Zusatz von Glucose zu Acetat umsetzenden Hefezellen — in zeitlich genauen Abständen — bestimmt wurde. Das Abstoppen der Inkubation erfolgte durch Zugabe von Eiswürfeln und Zentrifugieren in vorgekühlten Zentrifugenbechern. — Anschließend wurden die Hefezellen, wie oben dargestellt, aufgeschlossen.

5.) Messung des Wachstumsverlaufes der Hefezellen:

Um den Wachstumsverlauf von Hefe-Kulturen verfolgen zu können, wurde die Extinktion (in Klett-Einheiten) der im Medium suspendierten Hefezellen gemessen; dabei wurde das Klett-Summerson Photoelectric Colorimeter (Klett Manufac-

Malatdehydrogenase (47):

Hydrazin-Glycin-Puffer pH 9.5 0.18 M Hydrazin — 0.45 M

Glycin (7.5 g Glycin, 5.2 g Hydrazinsulfat, 0.2 g EDTA-

$\text{Na}_2\text{H}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ wurden in etwas Aqua dest. gelöst, 51 ml 2 N

NaOH zugegeben und mit Aqua dest. auf 100 ml aufgefüllt),

L-Malat 4.5×10^{-2} M, DPN 2.3×10^{-3} M; $d = 1.0$ cm.

Pyruvat-Kinase (33):

Triäthanolamin-Puffer pH 7.5 7.7×10^{-2} M, ADP $3.86 \times$

10^{-3} M, Na-Phosphoenolpyruvat 2.0×10^{-3} M, MgSO_4 9.65

$\times 10^{-3}$ M, KCl 5.8×10^{-2} M, DPNH 0.22×10^{-3} M, Lactat-

Dehydrogenase 0.1 mg; $d = 1.0$ cm.

Die Aktivitäten von Isocitratlyase und Malatsynthase wurden nach KORNBERG (6) bestimmt; dabei wurde das Spektralphotometer PMQ II (Carl Zeiss, Oberkochen/Württ.) verwendet.

Die Spaltbreite betrug 0.05 mm; $t = 22^\circ \text{C}$.

Isocitratlyase:

Phosphat-Puffer nach Sörensen pH 7.0 0.06 M, MgCl_2 $2.4 \times$

10^{-2} M, Phenylhydrazinhydrochlorid 3.8×10^{-3} M, Cystein-

hydrochlorid (neutralisiert mit NaOH) 0.024 M, DL-Isocitrat

0.015 M; $d = 1.0$ cm, $\lambda = 324$ nm.

Malatsynthase:

Phosphat-Puffer nach Sørensen pH 7.0 0.42 M, MgCl_2 3.33×10^{-3} M, Acetyl-Coenzym A (hergestellt nach STADTMAN (40)) 5.9×10^{-5} M, Natrium-Glyoxalat 6.7×10^{-4} M; $d = 1.0$ cm, $\lambda = 232$ nm.

7.) Manometrie:

Für die Messung der Sauerstoff-Aufnahme der Hefezellen wurden kegelförmige Warburg-Gefäße (Gesamtvolumen: 13 bis 15 ml) benutzt, die folgendermaßen beschickt waren:

Hauptraum: 1.54% Hefe in 7.7×10^{-2} M Citrat-Puffer pH 6.0 (Gesamtvolumen: 2.6 ml); Einsatz: 2 N NaOH 0.2 ml; Birne: Glucose oder Glucosederivate in Mengen, die nach dem Einkippen die jeweils angegebene Endkonzentration ergeben; Gasraum: Luft; die Temperatur betrug 25° C.

Die Hefezellen wurden vor der Messung der Sauerstoff-Aufnahme, wie früher beschrieben (45), verarmt.

8.) Protein-Bestimmung:

Die Protein-Bestimmung wurde nach der Biuret-Methode, wie bei BEISENHERZ et al. (1) angegeben, durchgeführt.

C. Ergebnisse

1.) Repression der Malatdehydrogenase:

Nach 4-stündiger Inkubation von Hefe (*Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*) mit Acetat oder Pyruvat beobachtet man, wie Tab. II zeigt, eine 8 bis 10 mal höhere spezifische Aktivität der Malatdehydrogenase als nach gleich langer Inkubation mit Glucose. Die Aktivitäten anderer Enzyme – Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, Hexokinase und Isocitrat-Dehydrogenase – zeigen nicht diese Unterschiede in den verschiedenen Medien. In der Mehrzahl der folgenden Versuche habe ich mich auf die Unterschiede der Enzym-Aktivitäten im Acetat-Medium und im Glucose-Medium beschränkt.

Zur Klärung der Frage, ob die Malatdehydrogenase-Synthese durch Acetat induziert oder durch Glucose reprimiert wird, wurde Hefe einmal mit Acetat, einmal mit Glucose und einmal mit Acetat und Glucose zusammen inkubiert. Tab. III zeigt, daß die Aktivität der Malatdehydrogenase in den beiden Ansätzen mit Glucose niedrig und nur im Ansatz mit Acetat allein hoch ist. Dieser Versuch macht es wahrscheinlich, daß die Malatdehydrogenase-Synthese durch Glucose unterdrückt

	Enzym-Aktivität ($\mu\text{Mol}/\text{min} \cdot \text{mg Protein}$) nach 4 Stdn. Inkubation		
	mit Glucose	mit Acetat	mit Pyruvat
Hexokinase	0.030	0.031	0.049
Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase	0.58	0.62	0.58
Isocitrat-Dehydrogenase	0.055	0.045	0.055
Malatdehydrogenase	0.088	0.81	0.64

Tab. II: Spezifische Aktivität von Hexokinase, Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, Isocitrat-Dehydrogenase und Malatdehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* nach Inkubation mit verschiedenen Kohlenstoff-Quellen.

1.5% Glucose⁺, 0.5% Na-Acetat⁺⁺ oder 3.0% Na-Pyruvat im Inkubations-Medium.

⁺) Die prozentuale Angabe von Glucose bezieht sich in den Tabellen und Abbildungen stets auf D-Glucose-Monohydrat.

⁺⁺) Die prozentuale Angabe von Na-Acetat bezieht sich in den Tabellen und Abbildungen stets auf Natrium-Acetat-Trihydrat.

	Enzym-Aktivität (μ Mol/min·mg Protein) nach 4 Stdn. Inkubation			
	ohne C-Quelle	mit Glucose	mit Acetat	mit Acetat + Glucose
Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase	0.46	0.52	0.46	0.56
Malatdehydrogenase	0.55	0.14	2.48	0.16

Tab. III: Spezifische Aktivität von Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und Malatdehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* nach Inkubation mit verschiedenen Kohlenstoff-Quellen und Einfluß von Glucose auf die Enzym-Aktivität bei Zusatz zur Inkubation mit Acetat.

1.0% Glucose, 0.5% Na-Acetat oder 1.0% Glucose + 0.5% Na-Acetat im Inkubations-Medium.

wird. Zur Kontrolle wurde die Aktivität der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase bestimmt; sie zeigt keine wesentlichen Veränderungen. Setzt man der Inkubation keine Kohlenstoff-Quelle zu, so findet eine geringe Enzymsynthese durch den Abbau endogener Substrate statt. Diese Beobachtung ist ein weiterer Hinweis darauf, daß es sich nicht um eine Induktion durch Acetat oder Pyruvat sondern um eine Repression durch Glucose handelt.

Tab. IV zeigt, daß auch bei Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae* der Sinner AG) die Synthese der Malatdehydrogenase durch Glucose gehemmt wird.

2.) Repression der Isocitratlyase und Malatsynthase:

Um Kenntnisse über die Bedeutung dieses "Glucose-Effektes" für den Zellstoffwechsel zu erhalten, wurden die Aktivitäten von Enzymen bestimmt, die Reaktionen katalysieren, die auf den gleichen Stoffwechselwegen liegen, wie die durch Malatdehydrogenase katalysierte Reaktion. Als erstes wurden Enzyme des Glyoxalat-Cyclus geprüft.

Das Ergebnis dieser Versuche zeigt Tab. V. Es wurde gefunden, daß außer der Malatdehydrogenase auch zwei weitere

	Enzym-Aktivität (μ Mol/min. mg Protein) nach 2 Stdn. Inkubation		
	mit Glucose	mit Acetat	mit Acetat + Glucose
Hexokinase	0.12	0.14	0.14
6-Phosphofruc- tokinase	0.08	0.10	0.12
Pyruvat-Decar- boxylase	0.47	0.45	0.41
Malatdehydroge- nase	1.24	4.00	1.07

Tab. IV: Spezifische Aktivität von Hexokinase, 6-Phospho-
fructokinase, Pyruvat-Decarboxylase und Malat-
dehydrogenase in Bäckerhefe (*Saccharomyces cere-*
visiae der Sinner A G) nach Inkubation mit verschie-
denen Kohlenstoff-Quellen und Einfluß von Glucose
auf die Enzym-Aktivität bei Zusatz zur Inkubation
mit Acetat.

3.0% Glucose, 3.0% Na-Acetat oder 3.0% Glucose +
3.0% Na-Acetat im Inkubations-Medium.

	Enzym-Aktivität (μ Mol/min·mg Protein) nach 4 Stdn. Inkubation				
	ohne C-Quelle	mit Glucose	mit Acetat	mit Acetat + Glucose	mit Pyruvat
Glucose-6- phosphat-De- hydrogenase	0.45	0.44	0.44	0.41	0.35
Malatdehydro- genase	0.57	0.35	2.70	0.32	1.49
Isocitratly- ase · 10 ³	2.60	0.81	133.0	0.58	60.0
Malatsyntha- se · 10 ³	33.3	4.33	388.0	9.57	148.0

Tab. V: Spezifische Aktivität von Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, Malatdehydrogenase, Isocitratlyase und Malatsynthase in *Saccharomyces cerevisiae* var. ellipsoideus nach Inkubation mit verschiedenen Kohlenstoff-Quellen und Einfluß von Glucose auf die Enzym-Aktivität bei Zusatz zur Inkubation mit Acetat. 1.5% Glucose, 1.5% Na-Acetat, 1.5% Na-Pyruvat oder 1.5% Na-Acetat + 1.5% Glucose im Inkubations-Medium.

Enzyme des Glyoxalat-Cyclus durch Glucose reprimiert werden: Isocitratlyase und Malatsynthase. Die spezifische Aktivität der Isocitratlyase ist nach Inkubation mit Acetat oder Pyruvat etwa 160 bzw. 70 mal höher als nach Inkubation mit Glucose; die spezifische Aktivität der Malatsynthase ist etwa 90 bzw. 35 mal höher nach Inkubation mit Acetat als nach Inkubation mit Glucose. Setzt man der Inkubation überhaupt keine Kohlenstoff-Quelle zu, so beobachtet man auch hier bei den durch Glucose reprimierbaren Enzymen eine gewisse Enzymsynthese durch den Abbau von endogenen Substraten.

Die spezifische Aktivität der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase wurde als ein nicht durch Glucose reprimierbares Enzym zur Kontrolle mitbestimmt.

In Tab. VI ist ein Versuch mit einem weiteren Stamm von *Saccharomyces cerevisiae* ("R 59", Ephrussi) dargestellt. Auch hier beobachtet man wieder die Repression der Enzyme des Glyoxalat-Cyclus — Malatdehydrogenase, Isocitratlyase und Malatsynthase — durch Glucose.

Führt man in dem obigen Versuch eine Trockengewichtsbestimmung der nach Inkubation mit Acetat oder Glucose ge-

	Enzym-Aktivität (μ Mol/min $\cdot$ mg Protein) nach 4 Std. Inkubation			
	ohne C-Quelle	mit Acetat	mit Glucose	mit Pyruvat
Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase	0.41	0.36	0.38	0.42
Pyruvat-Kinase	2.15	2.02	1.75	1.93
Malatdehydrogenase	0.52	2.02	0.52	1.90
Isocitratlyase $\cdot 10^3$	2.55	32.80	0.45	31.70
Malatsynthase $\cdot 10^3$	12.50	35.60	3.18	44.70

Tab. VI: Spezifische Aktivität von Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, Pyruvat-Kinase, Malatdehydrogenase, Isocitratlyase und Malatsynthase in *Saccharomyces cerevisiae* "R 59" (Ephrussi) nach Inkubation mit verschiedenen Kohlenstoff-Quellen.

1.5% Na-Acetat, 1.5% Glucose oder 3.0% Na-Pyruvat im Inkubations-Medium.

wonnenen Feuchthefe durch, so beträgt das Trockengewicht nach Inkubation in Acetat-Medium 14% und nach Inkubation in Glucose-Medium 21% der Feuchthefe.

Die daraufhin durchgeführte mikroanalytische Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl⁺) ergab einen Stickstoffgehalt von 3.59% bei der aus Acetat-Medium erhaltenen Trockenhefe und von 7.94% bei der aus Glucose-Medium erhaltenen Trockenhefe (Tab. VIa).

3.) Repression der Alkoholdehydrogenase:

Die dargestellten Versuche zeigen, daß Glucose die Synthese von Enzymen hemmt, die zur Neubildung von Hexosen aus C_2 - und C_3 -Kohlenstoffverbindungen führen und bei Anwesenheit von Glucose nicht benötigt werden. In dieses Bild paßt auch die Beobachtung, daß die Synthese der Alkoholdehydrogenase ebenfalls durch Glucose reprimiert wird, wie Tab. VII zeigt. Während die spezifische Aktivität der Malatdehydroge-

⁺) Die mikroanalytische Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl wurde vom Mikroanalytischen Laboratorium (Alfred Bernhardt) im Max-Planck-Institut für Kohlenforschung, Mülheim (Ruhr), ausgeführt.

	Nach Anzucht in Medium mit:	
	Acetat	Glucose
Trockengewicht in % des Feuchtgewichtes	14	21
Stickstoffgehalt in % des Trockengewichtes	3.59	7.94

Tab. VIa: Trockengewicht der Feuchtheife und Stickstoffgehalt des Trockengewichtes bei *Saccharomyces cerevisiae* "R 59" (Ephrussi) nach Anzucht in Acetat- bzw. Glucose-Medium.

1.5% Na-Acetat bzw. 1.5% Glucose im Medium.

nase mit Glucose $1/8$ derjenigen mit Acetat beträgt, ist die spezifische Aktivität der Alkoholdehydrogenase mit Glucose auf etwa $1/7$ derjenigen mit Acetat herabgesetzt.

4.) Kinetik der Aktivitäts-Zunahme von Alkoholdehydrogenase und Malatdehydrogenase:

Abb. 1 zeigt die Kinetik der Zunahme der Alkoholdehydrogenase- und Malatdehydrogenase-Aktivität in Acetat-Medium: Die Enzym-Aktivitäten steigen nach einer lag-Phase innerhalb von 8 Stunden steil an. Die zur Kontrolle mitbestimmte Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase-Aktivität bleibt in dieser Zeit unverändert. Ebenfalls unverändert bleiben die Aktivitäten von Alkoholdehydrogenase, Malatdehydrogenase und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase in einer Parallel-Inkubation mit Glucose.

Die Syntheserate der Enzymproteine ist abhängig von der Wachstumsphase, in der die Hefezellen geerntet worden sind; es wurden daher stets Zellen verwendet, die in der logarithmischen Wachstumsphase geerntet worden waren, da hiermit die höchsten Syntheseraten erreicht wurden. Die Syntheserate ist außerdem abhängig von dem Alter der Zellen nach der

	Enzym-Aktivität (μ Mol/min. mg Protein) nach 4 Stdn. Inkubation	
	mit Acetat	mit Acetat + Glucose
Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase	0.37	0.39
Malatdehydrogenase	3.13	0.38
Alkoholdehydrogenase	0.54	0.08

Tab. VII: Spezifische Aktivität von Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, Malatdehydrogenase und Alkoholdehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* nach Inkubation mit Acetat und Acetat + Glucose.

0.5% Na-Acetat bzw. 0.5% Na-Acetat + 1.5% Glucose im Inkubations-Medium.

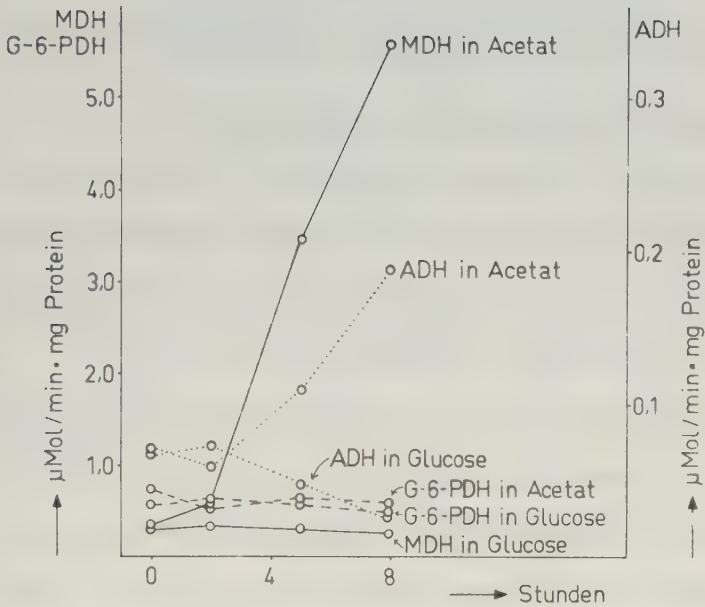


Abb. 1: Kinetik der Zunahme der spezifischen Aktivität von Alkoholdehydrogenase und Malatdehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* bei Inkubation mit Acetat.

0.5% Na-Acetat bzw. 1.0% Glucose im Inkubations-Medium.

Ernte; die höchsten Syntheseraten wurden bei Zellen erreicht, die wenige Stunden nach der Ernte verwendet worden waren.

5.) Einfluß von Proflavin und Actinomycin:

In weiteren Versuchen wurde geprüft, ob es sich bei der nach Inkubation mit Acetat beobachteten Zunahme der Enzym-Aktivitäten um eine Neusynthese von Enzymproteinen handelt, die bei der Inkubation mit Glucose gehemmt wird.

Aus diesem Grund wurde den Inkubationen mit Acetat einmal der Farbstoff Proflavin und einmal das Antibioticum Actinomycin C zugesetzt, die als Hemmstoffe der DNS-abhängigen RNS-Synthese bekannt sind. Die Tab. VIII zeigt, daß unter diesen Umständen ein Anstieg der Enzym-Aktivitäten genauso wie nach Inkubation mit Glucose ausbleibt. Auf die spezifische Aktivität der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase haben die zugesetzten Hemmstoffe keinen Einfluß.

Man kann also eine Neusynthese von Enzymprotein im Acetat-Medium und eine Hemmung dieser Synthese durch Glucose annehmen.

	Enzym-Aktivität (μ Mol/min·mg Protein) nach 4 Stdn. Inkubation				
	mit Acetat	mit Acetat + Glucose	mit Acetat + X	mit Acetat + XX	mit Acetat + XXX
Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase	0.50	0.48	0.41	0.70	0.57
Malatdehydrogenase	2.34	0.36	0.78	0.54	0.75
Isocitratlyase • 10^3	93.0	2.08	20.8	1.20	24.4
Malatsynthase • 10^3	229.0	8.7	35.3	5.7	48.5
Alkoholdehydrogenase	0.23	0.10	0.28	0.14	0.17

Tab. VIII: Einfluß von Glucose, Proflavin und Actinomycin C auf die spezifische Aktivität von Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, Malatdehydrogenase, Isocitratlyase, Malatsynthase und Alkoholdehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* bei Zusatz zur Inkubation mit Acetat.

0.5% Na-Acetat bzw. 0.5% Na-Acetat + 1.0% Glucose, + X = 25 mg Proflavin/250 ml, + XX = 100 mg Proflavin/250 ml oder + XXX = 80 mg Actinomycin C/250 ml im Inkubations-Medium.

6.) Repression unter anaeroben Bedingungen:

Daß die Repression der Enzymsynthesen durch Glucose auch unter anaeroben Bedingungen stattfindet, zeigt Tab. IX. Allerdings ist der Anstieg der Enzym-Aktivitäten von Isocitrat-lyase und Malatsynthase mit Acetat unter anaeroben Bedingungen nicht so hoch wie unter aeroben Bedingungen; bei der Malatdehydrogenase ist fast kein Anstieg zu beobachten.

Da nach den Versuchen von STOPPANI (41) Acetat von Hefezellen unter anaeroben Bedingungen nur bei Anwesenheit von ATP umgesetzt werden kann, kommt unter anaeroben Bedingungen die Enzymprotein-Synthese durch den Abbau endogener Substrate zustande. Der oben dargestellte Versuch ist deswegen interessant, weil er zeigt, daß es sich bei dem für den "Glucose-Effekt" verantwortlichen Metaboliten um eine Substanz handeln muß, die auch bei dem anaeroben Stoffwechsel entstehen kann.

7.) Abhängigkeit der Repression der Malatdehydrogenase von der Glucose-Konzentration:

Bei der Prüfung der Frage, welche Glucose-Konzentration zu einer Enzymsynthese-Hemmung erforderlich ist, ergab

	Enzym-Aktivität (μ Mol/min·mg Protein) nach 4 Std. Inkubation unter			
	anaeroben Bedingungen		aeroben Bedingungen	
	mit Acetat	mit Acetat + Glucose	mit Acetat	mit Acetat + Glucose
Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase	0.33	0.38	0.28	0.31
Malatdehydrogenase	0.37	0.30	2.33	0.32
Isocitratlyase • 10^3	8.13	0.58	190.0	1.10
Malatsynthase • 10^3	26.4	5.36	486.0	7.26

Tab. IX: Spezifische Aktivität von Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, Malatdehydrogenase, Isocitratlyase und Malatsynthase in *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* nach Inkubation mit Acetat und Acetat + Glucose unter aeroben und unter anaeroben Bedingungen.

0.5% Na-Acetat bzw. 0.5% Na-Acetat + 1.0% Glucose im Inkubations-Medium.

sich folgendes Ergebnis: Bei der Inkubation der Hefe mit Acetat und verschiedenen Glucose-Konzentrationen beobachtet man, wie Abb. 2 zeigt, daß geringe Glucose-Konzentrationen — etwa 1×10^{-3} M — zu einer Steigerung der Synthese der Malatdehydrogenase führen; bei etwa 5×10^{-3} M Glucose beginnt eine Hemmung der Malatdehydrogenase-Synthese, und bei 2.5×10^{-2} M Glucose ist die Malatdehydrogenase-Synthese fast völlig reprimiert.

Die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase-Aktivität bleibt bei den verschiedenen Glucose-Konzentrationen unverändert.

Eine Steigerung der Enzymsynthese durch geringe Glucose-Konzentrationen und Repression durch höhere Glucose-Konzentrationen ist auch für andere Enzyme in Mikroorganismen beschrieben (7, 8, 11, 21, 23).

8.) Zum Mechanismus der Repression durch Glucose:

Zur Frage nach dem Mechanismus der Repression der Enzymsynthese durch Glucose wurde folgender Versuch durchgeführt: Während des Anstiegs der spezifischen Aktivitäten von Alkoholdehydrogenase, Malatdehydrogenase, Isocitratlyase und Malatsynthase im Acetat-Medium wurde der Inkubation Glucose zugesetzt.

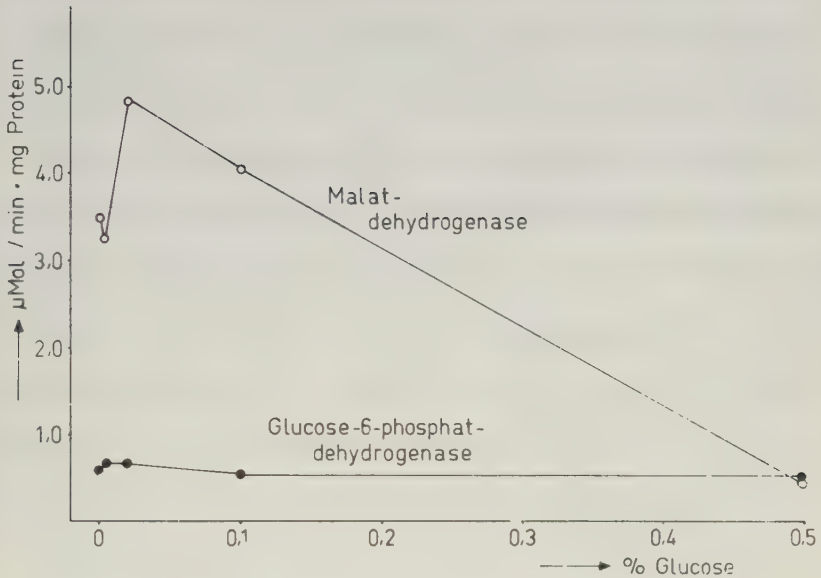


Abb. 2: Abhängigkeit der Malatdehydrogenase-Synthese-Hemmung in *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* von der Glucose-Konzentration.

0.5% Na-Acetat mit den angegebenen Glucose-Konzentrationen im Inkubations-Medium.

Wie Abb. 3 zeigt, kommt es nach der Glucose-Zugabe zu einer Abnahme der Enzym-Aktivitäten, die bei der Malatdehydrogenase am stärksten ausgeprägt ist. Bereits eine Stunde nach der Zugabe von Glucose ist die spezifische Aktivität der Malatdehydrogenase fast auf den Ausgangswert vor der Inkubation mit Acetat abgesunken. Die spezifische Aktivität der anderen Enzyme nimmt im Verhältnis zur Malatdehydrogenase wesentlich langsamer ab. — Versuche, die zur Klärung der Frage durchgeführt wurden, welches Abbauprodukt der Glucose die eigentlich reprimierende Substanz ist, zeigten, daß auch 2-Desoxy-D-Glucose genauso reprimierend auf die Enzymsynthesen wirkt wie Glucose; auf diese Versuche wird in diesem Zusammenhang später noch näher eingegangen werden.

Setzt man nun während des Anstiegs der spezifischen Aktivitäten von Alkoholdehydrogenase, Malatdehydrogenase, Isocitratlyase und Malatsynthase im Acetat-Medium der Inkubation 2-Desoxyglucose an Stelle von Glucose zu, so ergibt sich ein anderes Ergebnis als nach Zugabe von Glucose: Abb. 4 zeigt, daß es nach Zugabe von 2-Desoxyglucose nicht

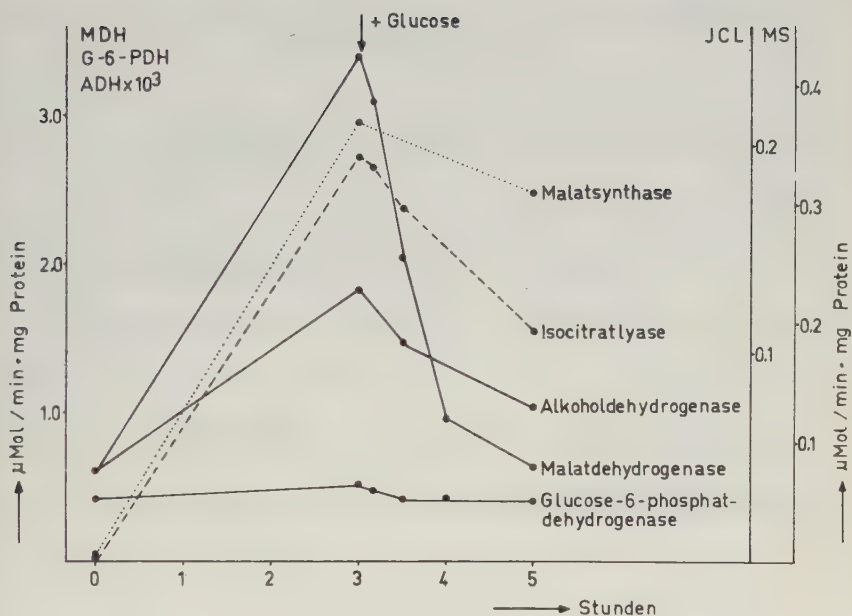


Abb. 3: Spezifische Aktivität von Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, Malatdehydrogenase, Isocitratlyase, Malatsynthase und Alkoholdehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* vor und nach Zusatz von Glucose zur Inkubation mit Acetat.

0.5% Na-Acetat im Inkubations-Medium; Glucose-Konzentration nach Zugabe: 1.0%.

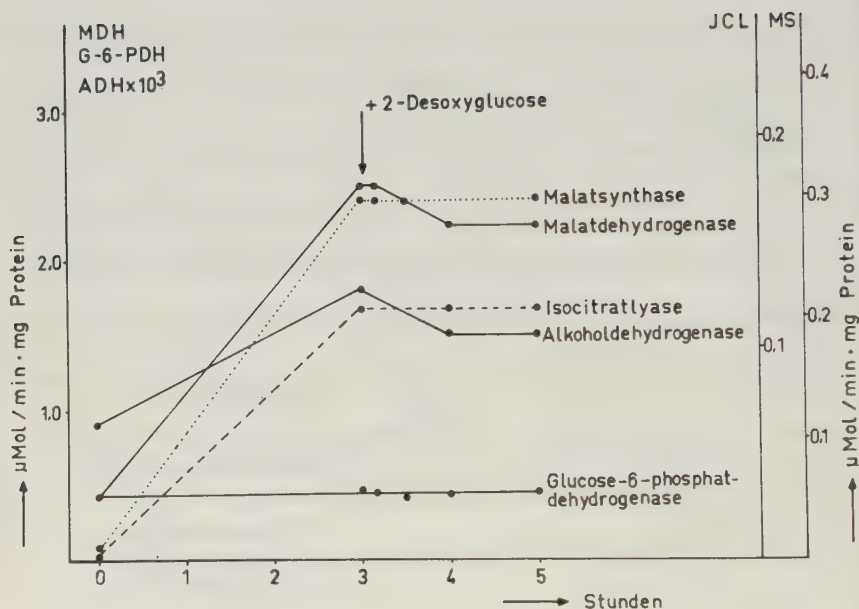


Abb. 4: Spezifische Aktivität von Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, Malatdehydrogenase, Isocitratlyase, Malatsynthase und Alkoholdehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* vor und nach Zusatz von 2-Desoxyglucose zur Inkubation mit Acetat.

0,5% Na-Acetat im Inkubations-Medium; 2-Desoxyglucose-Konzentration nach Zugabe: 0,25%.

zu einem Abfall der spezifischen Enzym-Aktivitäten kommt; man beobachtet lediglich Veränderungen der Aktivitäten, die im Bereich der Fehlerbreite der Enzym-Aktivitätsmessungen liegen.

Diese unterschiedlichen Ergebnisse sind verständlich, wenn man Folgendes berücksichtigt: Die bei diesen Versuchen verwendeten Hefezellen (*Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*) können nur mit Glucose als Kohlenstoff-Quelle wachsen, wie Abb. 5 zeigt.

Mit Acetat, Pyruvat oder Glycerin als Kohlenstoff-Quelle findet kein Wachstum statt; unter diesen Bedingungen kommt es bei diesem Hefestamm zur Ausbildung von Sporen, wie Abb. 6 zeigt. Als günstigstes flüssiges Sporulations-Medium erwies sich für *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* eine Lösung von 0.5% Na-Acetat $\times$ $3\text{H}_2\text{O}$. Darin beobachtet man fertig ausgebildete Sporen frühestens 30 Stunden nach Zugabe der Feuchtheife (0.2 g/100 ml), wenn die Kultur bei 30°C geschüttelt wird; nach 100 Stunden bestehen etwa 30% der Population aus Sporen. —Die in Abb. 5 dargestellte Wachstumskurve zeigt weiterhin, daß die Generationszeit der Zellen mit Glucose als Kohlenstoff-Quelle etwa 2 Stunden beträgt.

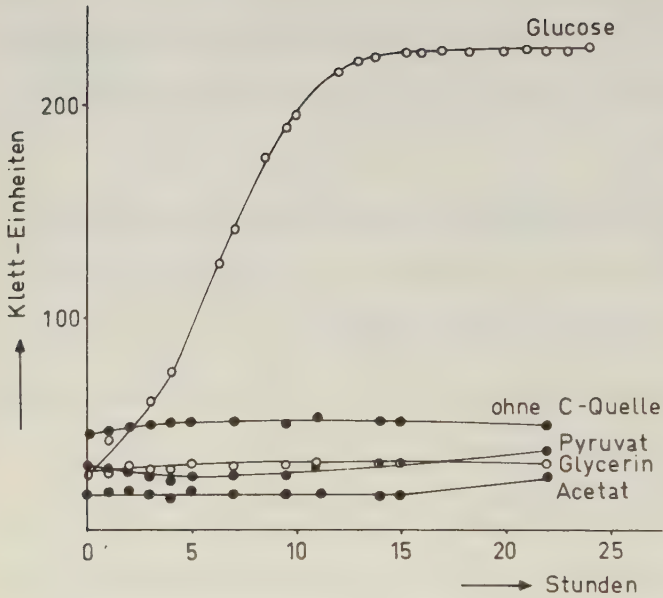


Abb. 5: Wachstumsverlauf von *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* mit verschiedenen Kohlenstoff-Quellen.

Glucose 0.08 M, Pyruvat und Glycerin 0.17 M und Acetat 0.25 M.

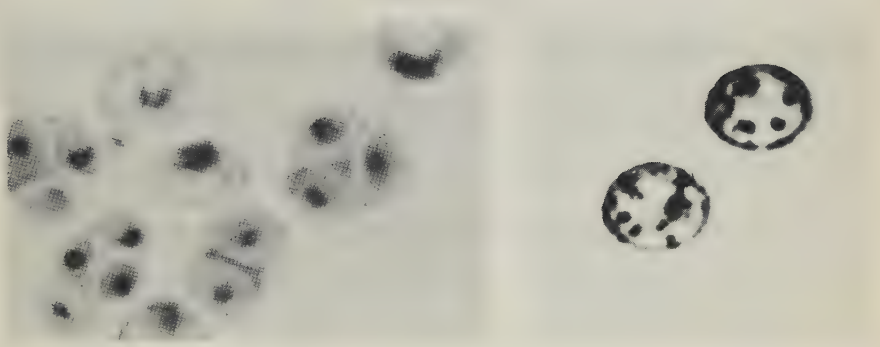


Abb. 6: Linke Bildhälfte: Sporen von *Saccharomyces cerevisiae*: Asci mit 2 bis 3 Ascosporen (nach: PONTE-FRACT (37a)).

Rechte Bildhälfte: Vegetative Hefezellen von *Saccharomyces cerevisiae*.

Überträgt man die Kenntnisse aus diesem Wachstumsversuch auf die Ergebnisse der in den Abbildungen 3 und 4 dargestellten Versuche, so ergeben sich folgende Erklärungen: Abb. 7a zeigt am Beispiel der Malatdehydrogenase und Isocitratlyase, daß sich die spezifischen Aktivitäten dieser beiden Enzyme 2 Stunden nach Zusatz von 2-Desoxyglucose fast gar nicht verändert haben. Nach Glucose-Zusatz dagegen hat die spezifische Aktivität der Isocitratlyase innerhalb von 2 Stunden um 45% und die spezifische Aktivität der Malatdehydrogenase um 83% abgenommen.

Bezieht man nun die Enzym-Aktivität als Gesamt-Aktivität auf die Gesamt-Population (Abb. 7b), indem man das Produkt aus der spezifischen Aktivität und der Extinktion bei 578 nm — die der Zellzahl proportional ist — bildet, so sieht man, daß die auf die Gesamt-Population bezogene Aktivität von Isocitratlyase und Malatdehydrogenase nach 2-Desoxyglucose-Zusatz unverändert geblieben ist; denn unter diesen Bedingungen kann kein Wachstum der Hefezellen stattfinden.

Da aber nach Zusatz von Glucose zum Acetat-Medium eine langsame Zunahme der Zellzahl einsetzt, beobachtet man

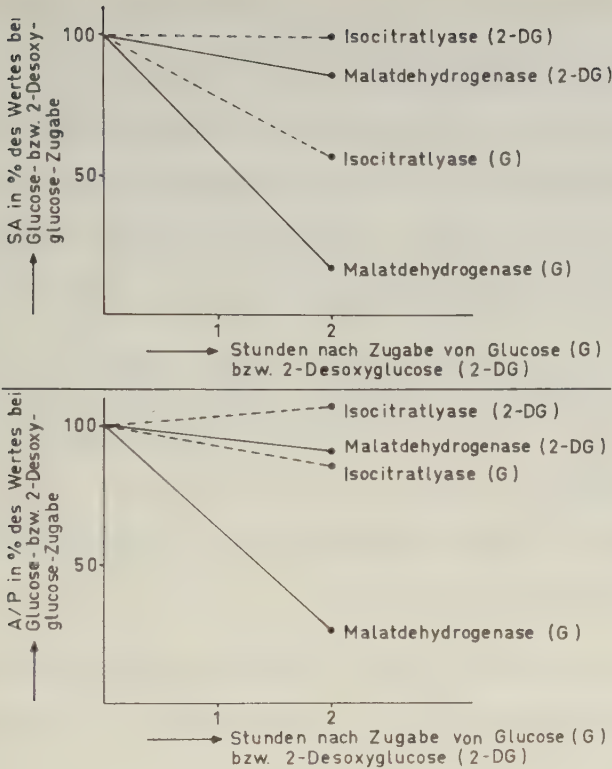


Abb. 7a: Spezifische Aktivität von Isocitratlyase und Malatdehydrogenase 2 Stunden nach Glucose- bzw. 2-Desoxyglucose-Zusatz in Acetat-Medium.

Abb. 7b: Produkt aus Aktivität und Gesamt-Zellpopulation bei Isocitratlyase und Malatdehydrogenase 2 Stunden nach Glucose- bzw. 2-Desoxyglucose-Zusatz in Acetat-Medium.

bei der Isocitratlyase, wenn man die Enzym-Aktivität auf die Gesamt-Zellzahl berechnet, daß es nach Zusatz von Glucose lediglich zu einer Hemmung der weiteren Synthese des Enzyms kommt, und die Aktivität – bezogen auf die Gesamt-Population – nur im Bereich der Fehlerbreite der Enzym-Aktivitätsbestimmung abnimmt. Die in Abb. 7a beobachtete Abnahme der spezifischen Aktivität ist lediglich durch eine Verdünnung des Enzyms durch Zunahme der Zellzahl vorge-täuscht worden.

Die gleichen Verhältnisse findet man für die Alkoholdehydrogenase und die Malatsynthase.

Bei der Malatdehydrogenase dagegen kommt es, auch wenn man die Zunahme der Zellzahl berücksichtigt, zu einer beträchtlichen Abnahme der auf die Gesamt-Population bezogenen Aktivität: nämlich um 75%.

Glucose bewirkt also bei Alkoholdehydrogenase, Isocitratlyase und Malatsynthase eine Hemmung der weiteren Synthese; bei der Malatdehydrogenase kommt es über die Hemmung der weiteren Synthese hinaus zu einer raschen Abnahme der spezifischen Aktivität. 2-Desoxyglucose bewirkt dagegen bei

jedem dieser Enzyme, auch bei der Malatdehydrogenase, nur eine Hemmung der Synthese. Ob Glucose bei der Malatdehydrogenase überhaupt eine Synthese-Hemmung bewirkt oder ob nur der inaktivierende Effekt existiert, kann nicht definitiv entschieden werden. Die Analogie zur 2-Desoxyglucose spricht jedoch für ein Nebeneinander beider Effekte.

9.) Einfluß verschiedener C₆-Kohlenstoffverbindungen auf die Malatdehydrogenase-Synthese:

Zur Frage, ob Glucose selbst oder ein Abbauprodukt die Hemmung der Enzymsynthese bewirkt, wurde die Wirkung verschiedener C₆-Kohlenstoffverbindungen auf die Malatdehydrogenase-Synthese untersucht. Tab. X zeigt, daß Fructose, Mannose, 2-Desoxyglucose, D-Glucosamin und α -Methylglucosid die gleiche reprimierende Wirkung auf die Enzymsynthese haben wie D-Glucose; L-Glucose dagegen unterdrückt die Enzymsynthese nicht.

Von diesen Substanzen sind 2-Desoxyglucose und Glucosamin besonders interessant, da die anderen reprimierenden Substanzen in Hefe zu Glucose umgesetzt werden können und dadurch ihre Wirkung auf die Enzymsynthese ausüben.

Zu der Beobachtung, daß 2-Desoxyglucose und Glucosamin die gleiche Wirkung auf die Enzymsynthese haben wie Glucose, werden im Folgenden noch weitere Versuche mitgeteilt werden.

Fernerhin ist aus Tab. X ersichtlich, daß Gluconsäure nicht reprimierend wirkt. Da manometrische Versuche ergaben, daß Gluconsäure von dem verwendeten Hefestamm umgesetzt wird, scheidet damit für das hier gezeigte System die Annahme von MAGASANIK (25) aus, daß die reprimierende Substanz beim "Glucose-Effekt" Gluconsäure sei.

Sorbitol hat ebenfalls keine reprimierende Wirkung. Hier zeigten manometrische Versuche, daß Sorbitol von den Hefezellen zwar veratmet wird; eine aerobe oder anaerobe Gärung findet jedoch mit Sorbitol nicht statt. Sorbitol kann von den Hefezellen nicht zu der reprimierenden Substanz umgesetzt werden.

10.) Repression durch 2-Desoxyglucose und Glucosamin:

Die Wirkung von 2-Desoxyglucose und Glucosamin wurde weiter untersucht. Tab. XI zeigt, daß bei Inkubation von

	Enzym-Aktivität (μ Mol/min·mg Protein) nach 4 Stdn. Inkubation	
Inkubations-Medium und Zugabe von:	Malatdehydrogenase	Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase
Acetat	3.70	0.42
Acetat + D-Glucose	0.19	0.48
Acetat + L-Glucose	2.92	0.39
Acetat + Fructose	0.21	0.52
Acetat + Mannose	0.25	0.51
Acetat + 2-Desoxyglucose	0.45	0.41
Acetat + Glucosamin	0.59	0.40
Acetat + α -Methylglucosid	0.45	0.50
Acetat + Gluconsäure	3.58	0.43
Acetat + Sorbitol	3.15	0.42

Tab. X: Spezifische Aktivität von Malatdehydrogenase und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* nach Inkubation mit Acetat bzw. Acetat und Zugabe verschiedener C_6 -Kohlenstoffverbindungen.

0.5% Na-Acetat bzw. 0.5% Na-Acetat + 1.0% der aufgeführten C_6 -Kohlenstoffverbindungen im Inkubations-Medium.

	Enzym-Aktivität (μ Mol/min·mg Protein) nach 4 Stdn. Inkubation			
	mit Acetat	mit Acetat + Glucose	mit Acetat + Glucos- amin	mit Acetat + 2-Des- oxyglu- cose
Glucose-6-phosphat- Dehydrogenase	0.35	0.42	0.39	0.37
Malatdehydrogenase	2.99	0.38	0.32	0.30
Isocitratlyase · 10 ³	151.0	1.10	0.34	0.66
Malatsynthase · 10 ³	431.0	4.7	1.8	5.6
Alkoholdehydro- genase	0.33	0.08	0.08	0.10

Tab. XI: Spezifische Aktivität von Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, Malatdehydrogenase, Isocitratlyase, Malatsynthase und Alkoholdehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* nach Zusatz von Glucose, Glucosamin oder 2-Desoxyglucose zur Inkubation mit Acetat.

0.5% Na-Acetat bzw. 0.5% Na-Acetat + 1.0% Glucose, 1.0% Glucosamin oder 1.0% 2-Desoxyglucose im Inkubations-Medium.

Saccharomyces cerevisiae var. *ellepsoideus* mit Acetat und 2-Desoxyglucose bzw. Glucosamin außer der spezifischen Aktivität der Malatdehydrogenase auch die spezifischen Aktivitäten von Alkoholdehydrogenase, Isocitratlyase und Malatsynthese ebenso niedrig sind wie nach Inkubation mit Acetat + Glucose. Die spezifische Aktivität der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase bleibt wieder unbeeinflusst.

11.) Abhängigkeit der Repression der Malatdehydrogenase von der 2-Desoxyglucose- und Glucosamin-Konzentration:

Von 2-Desoxyglucose bzw. Glucosamin benötigt man wesentlich kleinere Mengen als von Glucose, um die Enzymsynthese zu hemmen. Abb. 8 zeigt die Abhängigkeit der Synthese-Hemmung der Malatdehydrogenase von der Konzentration an Glucose, 2-Desoxyglucose und Glucosamin. Während 0.02% Glucose noch zu einer Steigerung der Enzymsynthese führen, ist mit 0.02% 2-Desoxyglucose die Enzymsynthese bereits völlig gehemmt. Von Glucosamin wird 0.1% benötigt, um die Enzymsynthese fast völlig zu hemmen. Bei Glucose beobachtet man erst bei 0.5% eine vollständige Repression.

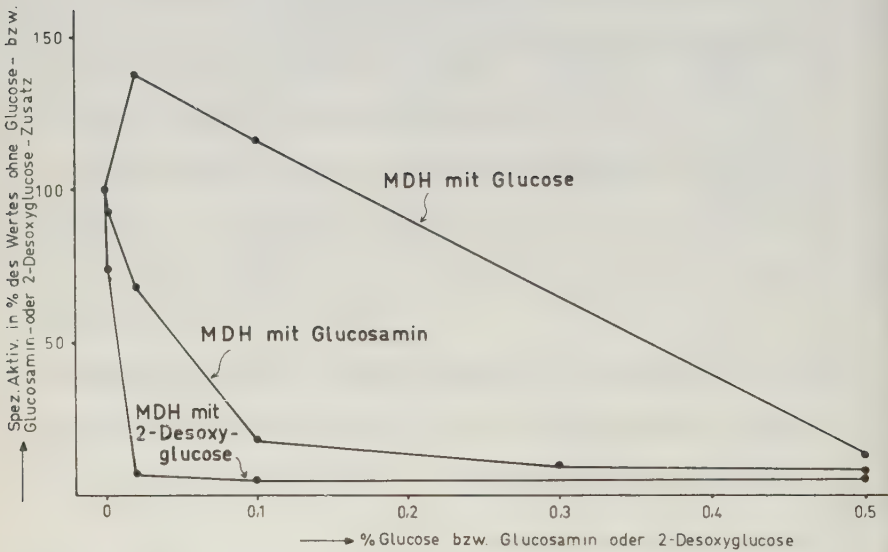


Abb. 8: Abhängigkeit der Malatdehydrogenase-Synthese-Hemmung in *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* von der Glucose-, Glucosamin- und 2-Desoxyglucose-Konzentration.

0.5% Na-Acetat mit den angegebenen Konzentrationen an Glucose, Glucosamin oder 2-Desoxyglucose im Inkubations-Medium.

Diese Konzentrations-Abhängigkeit ist verständlich. 2-Desoxyglucose und Glucosamin werden von der Hefezelle nur phosphoryliert und danach nicht weiter umgesetzt. Es kommt also rasch zu einer Anhäufung von 2-Desoxyglucose und Glucosamin bzw. 2-Desoxyglucose-6-phosphat und Glucosamin-6-phosphat, während Glucose schnell abgebaut wird und eine wesentlich größere Menge angeboten werden muß, um eine bestimmte Konzentration an Glucose oder Abbauprodukten von Glucose in der Zelle zu erreichen.

12.) Einfluß von 2-Desoxyglucose und Glucosamin auf den Stoffwechsel der Hefezellen:

Abb. 9 zeigt, daß 2-Desoxyglucose und Glucosamin von *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* nicht oxydiert werden. Außerdem ist aus dieser Abbildung ersichtlich, daß die Sauerstoff-Aufnahme der Hefe mit Glucose durch Zusatz dieser beiden Substanzen nicht beeinflußt wird.

Auch das Wachstum von Hefezellen mit Glucose als Kohlenstoff-Quelle wird durch den Zusatz von 2-Desoxyglucose oder Glucosamin nicht wesentlich beeinflußt, wie Abb. 10 zeigt. Mit 2-Desoxyglucose oder Glucosamin als einziger Kohlenstoff-Quelle findet kein Wachstum der Hefezellen statt.

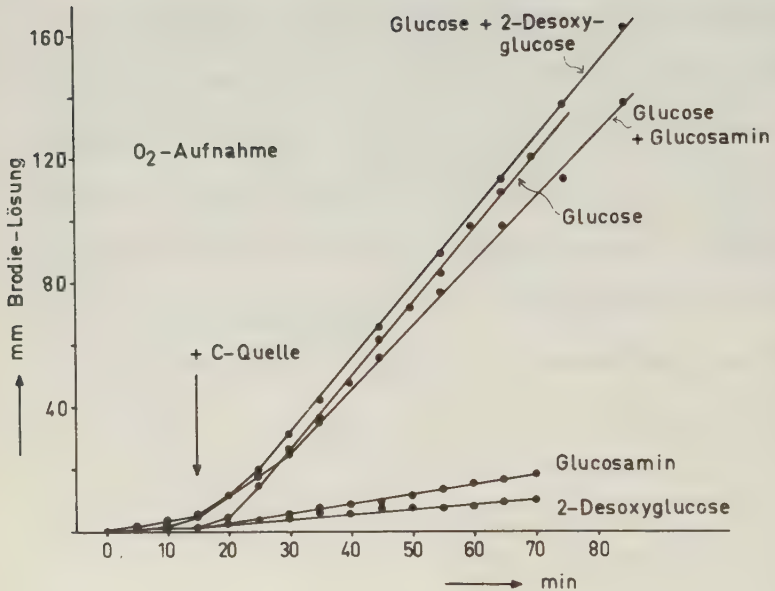


Abb. 9: Sauerstoff-Aufnahme von *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* mit Glucosamin und 2-Desoxyglucose und Einfluß dieser Glucosederivate auf die Sauerstoff-Aufnahme mit Glucose.

Jeweils 3.0% der angegebenen Hexosen im Inkubations-Medium.

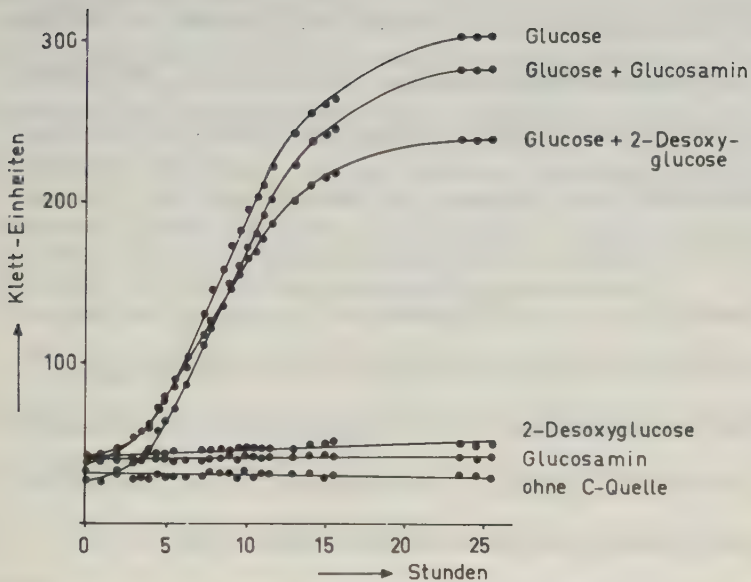


Abb. 10: Wachstumsverlauf von *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* mit Glucosamin und 2-Desoxyglucose und Einfluß dieser Glucosederivate auf den Wachstumsverlauf mit Glucose.

3.0% Glucose, 3.0% Glucosamin, 3.0% 2-Desoxyglucose bzw. 3.0% Glucose + 1.0% Glucosamin und 3.0% Glucose + 0.05% 2-Desoxyglucose im Inkubations-Medium.

Die Versuche mit 2-Desoxyglucose und Glucosamin zeigen, daß für die reprimierende Wirkung der Glucose auf die Synthese von Alkoholdehydrogenase, Isocitratlyase, Malatdehydrogenase und Malatsynthase keine Metabolite der Glucose verantwortlich sein können, die beim Abbau der Glucose unterhalb von Glucose-6-phosphat liegen, da diese beiden Glucosederivate in der Hefezelle nur phosphoryliert und danach nicht weiter abgebaut werden. Die Versuche sagen aber nichts darüber aus, ob die Repression durch Glucose oder Glucose-6-phosphat — oder eventuell durch die mit der Phosphorylierung von Glucose verknüpften Änderung der Spiegel von ATP und ADP — verursacht wird.

gie für die Proteinsynthese aus dem Abbau endogener Substrate gewonnen wird. Inkubiert man Hefezellen mit Glucose ohne Acetat oder Pyruvat, so liegen die Enzym-Aktivitäten niedriger als bei Inkubation ohne Kohlenstoff-Quelle. Glucose hemmt also auch die ohne Induktor stattfindende Enzymsynthese. (Allerdings kann eine endogene Bildung des Induktors nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden.)

Diese Versuche sprechen dagegen, daß die Synthese von Malatdehydrogenase, Isocitratlyase und Malatsynthese durch eine spezifische Substanz induziert wird und daß Glucose nur die durch Induktion zustandegekommene Enzymsynthese hemmt.

2.) Bedeutung des "Glucose-Effektes" für den Stoffwechsel der Hefezelle:

Die Beobachtung, daß auch die an der Gluconeogenese aus C_2 - und C_3 -Kohlenstoffverbindungen beteiligte Alkoholdehydrogenase durch Glucose reprimiert wird, rundet das Bild von der Bedeutung dieses "Glucose-Effektes" für den Stoffwechsel der Hefezelle ab: Der "Glucose-Effekt" ist ein wichtiges Regulationsprinzip der Hefezelle.

Steht der Hefezelle genügend Glucose zur Verfügung, so kann sie durch Repression von Enzymsynthesen die Neubildung von Hexosen aus anderen Substraten unterdrücken und damit den Stoffwechsel ökonomisch ablaufen lassen. Die Abb. 11 veranschaulicht diese Vorstellungen; sie zeigt die Bildung von Hexosephosphaten aus C_2 - und C_3 -Kohlenstoffverbindungen. Aus Äthanol, Acetat und Pyruvat kann über Acetyl-CoA, den Glyoxalat-Cyclus und Succinat $\longrightarrow$ Fumarat $\longrightarrow$ Malat $\longrightarrow$ Oxalacetat $\longrightarrow$ Phosphoenolpyruvat gebildet werden. Dadurch können die beiden praktisch irreversiblen Schritte der Glycolyse — Pyruvat $\longrightarrow$ Acetyl-CoA und Phosphoenolpyruvat $\longrightarrow$ Pyruvat — überwunden werden und die Bildung von Hexosephosphaten erfolgen. — Die von uns als durch Glucose reprimierbar gefundenen Enzyme sind an dieser Gluconeogenese beteiligt; im Schema der Abb. 11 ist ihre spezifische Aktivität mit Acetat, bezogen auf die spezifische Aktivität mit Glucose, die gleich 1 gesetzt wurde, angegeben. Die spezifische Aktivität der Malatdehydrogenase ist im Durchschnitt mit Acetat etwa 8 mal höher als mit Glucose; die spezifische Aktivität der Malatsynthase ist etwa 100 mal und die spezifische Aktivität der Isocitratlyase sogar 150 mal

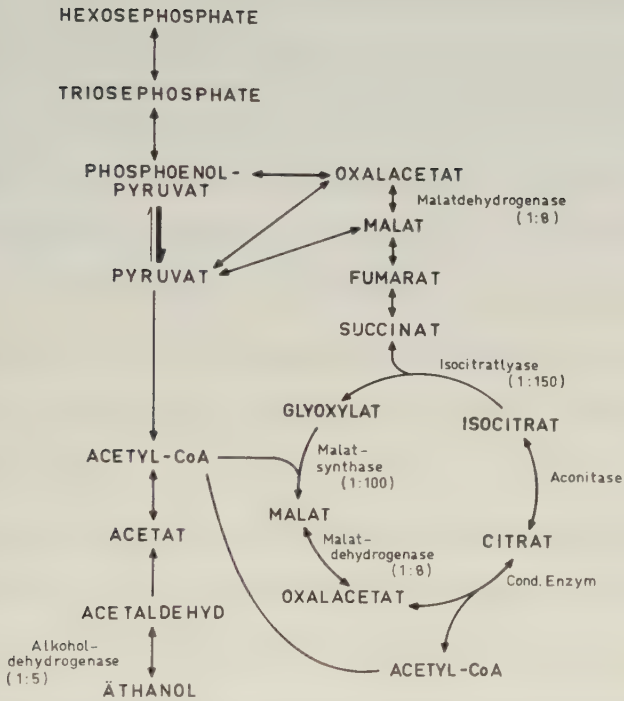


Abb. 11: Bildung von Hexosephosphaten aus C_2 - und C_3 -Kohlenstoffverbindungen in Hefezellen.

höher mit Acetat als mit Glucose; bei der Alkoholdehydrogenase beträgt dieses Verhältnis 1 : 5.

Malatsynthase und Isocitratlyase gehören zu den Schrittmacher-Enzymen des Glyoxalat-Cyclus; daher bewirken Änderungen der Aktivitäten dieser Enzyme entsprechende Änderungen der Geschwindigkeit des Cyclus und damit auch der Stoffwechselwege, an denen dieser Cyclus beteiligt ist.

Da es sich bei *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* um einen Hefestamm handelt, der vorzugsweise in Acetat-Medium Sporen ausbildet (vgl. S. 49), können die in diesem Medium beobachteten Änderungen der Enzym-Aktivitäten auch als Umstellung des Stoffwechsels in der Vorbereitungs-Phase der Sporenbildung angesehen werden.

3.) Mögliche Gründe für die rasche Aktivitäts-Abnahme der Malatdehydrogenase nach Glucose-Zugabe:

Wie die Abbildungen 7a und 7b (S. 53) zeigen, ist die Wirkung der Glucose auf die reprimierbaren Enzyme nicht in allen Fällen gleich: Während Glucose-Zusatz zu Acetat umsetzenden Hefezellen bei Alkoholdehydrogenase, Isocitratlyase und Malatsynthase eine Hemmung der Enzymsynthese

bewirkt, kommt es bei der Malatdehydrogenase neben der Enzymsynthese-Hemmung zu einer Aktivitäts-Abnahme.

Nach diesem Ergebnis könnte man einen raschen Protein-turnover der Malatdehydrogenase annehmen. Die in den Abbildungen 7a und 7b gleichfalls dargestellte Wirkung der 2-Desoxyglucose auf die Enzym-Aktivitäten macht diese Möglichkeit sehr unwahrscheinlich, da nach 2-Desoxyglucose-Zusatz zu Acetat umsetzenden Hefezellen bei der Malatdehydrogenase neben der Synthese-Hemmung keine Aktivitäts-Abnahme auftritt.

Zu diskutieren wäre die Induktion Enzymprotein-abbauender Enzyme durch Glucose. Diese induzierten Enzyme müßten dann allerdings spezifisch für Malatdehydrogenase-Protein sein. — Die wahrscheinlichste Möglichkeit ist eine Konformationsänderung der Malatdehydrogenase nach Glucose-Zusatz. Bei in vitro-Versuchen wurde kein direkter Einfluß von Glucose auf die Malatdehydrogenase-Aktivität gefunden. Wurde ein Hefeextrakt mit hoher Malatdehydrogenase-Aktivität mit Glucose, mit Glucose + ATP oder mit Glucose-6-phosphat über längere Zeit inkubiert, so blieb die Malatde-

hydrogenase-Aktivität unverändert. Glucose oder die in diesen Ansätzen entstandenen Abbauprodukte von Glucose führen demnach nicht zu einer Änderung der Enzym-Konformation.

4.) Zur Frage des eigentlichen Repressors beim "Glucose-Effekt":

Die reprimierende Wirkung der Glucose auf die Enzymsynthesen dürfte ein wesentlich komplexerer Vorgang sein als die übliche Enzym-Repression. — In den meisten Fällen bewirkt bei der Enzym-Repression das Produkt einer enzymatischen Reaktionsfolge, sobald es in einer bestimmten Konzentration in der Zelle vorliegt, eine Hemmung der Synthese der Enzyme, die seine Bildung katalysieren. Glucose dagegen kann einerseits Enzyme des Glucose-Stoffwechsels hemmen, andererseits aber auch Enzyme, die keine direkte Beziehung zum Glucose-Stoffwechsel haben, wie die Tab. I (S. 14) zeigt. Dazu kommt, daß bei einigen dieser Enzyme auch andere Kohlenstoffverbindungen, wie z. B. Glycerin oder Gluconat, eine der Glucose analoge Wirkung auf die Enzymsynthese haben.

Zunächst wurde die hemmende Wirkung der Glucose auf Enzymsynthesen unter dem Begriff "Glucose-Effekt" zusammengefaßt. Die Arbeiten von MAGASANIK, MANDELSTAM und HALVORSON machten es dann aber wahrscheinlich, daß nicht Glucose selbst sondern Abbauprodukte der Glucose zur Bildung des Repressors führen. Daher wurde an Stelle der Bezeichnung "Glucose-Effekt" der Begriff "Katabolit-Repression" von diesen Autoren eingeführt. — Da aber trotz der zahlreichen Arbeiten über "Katabolit-Repression" nicht gezeigt werden konnte, welche Katabolite der Glucose zu der Enzymsynthese-Hemmung führen, und man auch in Betracht ziehen muß, daß Substanzen reprimierend wirken können, die auf einem anderen als dem katabolen Stoffwechselweg aus Glucose entstehen, wurde von MANDELSTAM (29) die Bezeichnung "Metabolit-Repression" anstatt "Glucose-Effekt" bzw. "Katabolit-Repression" vorgeschlagen.

Die in dieser Arbeit dargestellten Versuche mit Glucose-derivaten führten zu Ergebnissen, die für dieses System wahrscheinlich machen, daß die Hemmung der Enzymsynthese nur durch Glucose selbst oder durch Glucose-6-phosphat

hervorgerufen sein kann.

Glucosamin und 2-Desoxyglucose haben auf die Synthese der Alkoholdehydrogenase, Malatdehydrogenase, Isocitratlyase und Malatsynthase die gleiche reprimierende Wirkung wie Glucose. Glucosamin und 2-Desoxyglucose werden in der Hefezelle nur phosphoryliert und dann nicht weiter abgebaut (2, 3). Die manometrischen Versuche zur Messung der Sauerstoff-Aufnahme der Hefezellen (Abb. 9, S. 62) und die Wachstumskurven (Abb. 5, S. 50) zeigen, daß auch der in diesen Versuchen verwendete Hefestamm diese beiden Glucosederivate nicht als Energiequelle verwenden kann. Für die reprimierende Wirkung der Glucose auf die Synthese von Alkoholdehydrogenase, Malatdehydrogenase, Isocitratlyase und Malatsynthase können also keine Katabolite der Glucose in Frage kommen, die im Abbauweg der Glucose unterhalb von Glucose-6-phosphat liegen. Die Versuche lassen allerdings keine Entscheidung zu, ob Glucose selbst oder Glucose-6-phosphat für die Synthese-Hemmung verantwortlich ist. — Außerdem muß als möglicher Mechanismus der Hemmung ein Mangel an ATP bzw. eine Anhäufung von ADP in Betracht gezogen werden, da zur Phosphorylierung von 2-Desoxyglu-

cose und Glucosamin ATP verbraucht wird, aber eine Neusynthese nicht stattfinden kann, da 2-Desoxyglucose-6-phosphat und Glucosamin-6-phosphat in der Zelle nicht weiter umgesetzt werden.

MANDELSTAM (27) äußerte die Vermutung, daß ATP der Repressor der "Katabolit-Repression" sei, da der Repressor sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Stoffwechselbedingungen entstehen kann. Die hier dargestellten Versuche zeigen zwar, daß die Repression durch Glucose sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen stattfinden kann; ATP scheidet aber als Repressor-Substanz in diesen Versuchen aus, da es nach 2-Desoxyglucose- bzw. Glucosamin-Zugabe zu einer erheblichen Abnahme der ATP-Konzentration in der Zelle kommt.

Diese Ergebnisse schränken die Zahl der für das in dieser Arbeit dargestellte System als reprimierende Substanzen in Frage kommenden Metabolite wesentlich ein; sie unterstützen die Vermutung, daß sich der Komplex des "Glucose-Effektes" letztlich in einzelne, für ein Enzym oder für eine Enzymgruppe spezifische, Repressionen auflösen wird. Im

Einklang damit steht die Beobachtung von KORNBERG (18), daß bei der Repression der Isocitratlyase in *E. coli* durch Glucose die eigentlich reprimierende Substanz sehr wahrscheinlich Phosphoenolpyruvat ist. — Für das in der vorliegenden Arbeit dargestellte System wäre es möglich, daß sich die "Metabolit-Repression" als eine Glucose-Repression oder Glucose-6-phosphat-Repression erweist. — Daher wurde in der vorliegenden Arbeit auch davon abgesehen, die neueren Bezeichnungen "Katabolit-Repression" bzw. "Metabolit-Repression" statt "Glucose-Effekt" zu verwenden. Eine Neubenennung des Effektes ist erst dann sinnvoll, wenn die zugrundeliegenden Mechanismen aufgeklärt sind.

E. Zusammenfassung

In verschiedenen Stämmen von *Saccharomyces cerevisiae* wird die Synthese der an der Gluconeogenese aus C_2 - und C_3 -Kohlenstoffverbindungen beteiligten Enzyme Alkoholdehydrogenase, Malatdehydrogenase, Isocitratlyase und Malatsynthese durch Glucose reprimiert.

Diese Befunde ermöglichen es, die als "Glucose-Effekt" an anderen Enzymen bereits bekannte Repression der Enzymsynthese unter einem übergeordneten Gesichtspunkt einzuordnen. Es handelt sich um ein generelles Regulationsprinzip der Hefezelle: Bei Anwesenheit von Glucose kann die Zelle durch Repression von Enzymen der Gluconeogenese die Neubildung von Hexosen aus anderen Substraten unterdrücken und damit den Stoffwechsel ökonomisch ablaufen lassen. Die Gluconeogenese unterliegt demnach ebenso einer "Endprodukthemmung", wie dies seit längerem für die Biosynthese von Aminosäuren und Nucleotiden bekannt ist.

Versuche zum Mechanismus des "Glucose-Effektes" zeigten, daß Glucose bei Alkoholdehydrogenase, Isocitratlyase und Malatsynthese eine Hemmung der Enzymsynthese bewirkt.

Bei der Malatdehydrogenase bewirkt Glucose außer der Hemmung der Enzymsynthese eine rasche Abnahme der Enzym-Aktivität.

Da 2-Desoxyglucose und Glucosamin genauso reprimierend auf die Enzymsynthesen wirken wie Glucose, kann man annehmen, daß die Repression der Synthese von Alkoholdehydrogenase, Malatdehydrogenase, Isocitratlyase und Malatsynthase wahrscheinlich nur durch Glucose selbst oder Glucose-6-phosphat verursacht sein kann. Damit ist die Zahl der für den "Glucose-Effekt" an diesen Enzymen in Frage kommenden Metabolite der Glucose wesentlich eingeschränkt worden.

F. Literaturverzeichnis

- 1 BEISENHERZ, G., H.J. BOLTZE, Th. BÜCHER, R. CZOK, K.H. GARBADE, E. MEYER-ARENDT und G. PFLEIDERER: Z. Naturforsch. 8b, 555 (1953).
- 2 BROWN, D.H.: BBA 7, 487 (1951).
- 3 CRAMER, F.B. and G.E. WOODWARD: J. Franklin Inst. 253, 354 (1952).
- 4 DAVIES, R.: Biochem. J. 55, 484 (1953).
- 5 DAVIES, A.: J. Gen. Microbiol. 14, 425 (1956).
- 6 DIXON, G.H. and H.L. KORNBERG: Biochem. J. 72, 3 P (1959).
- 7 DODYK, F. and A. ROTHSTEIN: ABB 104, 478 (1964).
- 8 DURHAM, N. N. and D.L. MCPHERSON: J. Bact. 80, 7 (1960).
- 9 EPPS, H.M.R. and E.F. GALE: Biochem. J. 36, 619 (1942).
- 10 HALPERN, Y.S., A. EVEN-SHOSHAN and M. ARTMAN: BBA 93, 228 (1964).
- 11 HAUGE, J.G., A.M. MACQUILLAN, A.L. CLINE and H.O. HALVORSON: BBRC 5, 267 (1961).
- 12 HERZENBERG, L.A.: BBA 31, 525 (1959).
- 13 HOLZER, H., G. SCHULTZ, C. VILLAR-PALASI und J.JÜNTGEN-SELL: Biochem. Z. 327, 331 (1956).
- 14 JACOBY, G.A.: Biochem. J. 92, 1 (1964).
- 15 KOHLHAW, G.: unveröffentliche Versuche.

- 16 KORNBERG, A. and B.L. HORECKER: Methods of Enzymology I, 323, Academic Press Inc., Publishers, New York (1955).
- 17 KORNBERG, H.L.: Proceedings of the Fourth International Congress of Biochemistry, Vienna 1958, XIII, 251, Pergamon Press, London, New York, Paris, Los Angeles (1959).
- 18 KORNBERG, H.L., J. DENNIS and E.M. WILSON: Biochem. J. 92, 55 P (1964).
- 19 LING, K.-H., W.L. BYRNE and H. LARDY: Methods of Enzymology I, 306, Academic Press Inc., Publishers, New York (1955).
- 20 LOOMIS, W.F. jr. and B. MAGASANIK: J. Mol. Biol. 8, 417 (1964).
- 21 MACQUILLAN, A.M. and H.O. HALVORSON: J. Bact. 84, 23 (1962).
- 22 MACQUILLAN, A.M. and H.O. HALVORSON: J. Bact. 84, 31 (1962).
- 23 MACQUILLAN, A.M., S. WINDERMAN, H.O. HALVORSON: BBRC 3, 77 (1960).
- 24 MAGASANIK, B.: J. Biol. Chem. 213, 557 (1955).
- 25 MAGASANIK, A.K. and A. BOJARSKA: BBRC 2, 77 (1960).
- 26 MAGASANIK, B., F.C. NEIDHARDT and A.P. LEVIN: Proceedings of the International Symposium on Enzyme Chemistry, Tokyo and Kyoto 1957, S. 374, Maruzen, Tokyo (1958).
- 27 MANDELSTAM, J.: Biochem. J. 79, 489 (1961).
- 28 MANDELSTAM, J.: Biochem. J.: 82, 489 (1962).

- 29 MCFALL, E. and J. MANDELSTAM: Biochem. J. 89, 391 (1963).
- 30 MCFALL, E. and J. MANDELSTAM: Nature 197, 880 (1963).
- 31 NAKADA, D. and B. MAGASANIK: BBA 61, 835 (1962).
- 32 NAKADA, D. and B. MAGASANIK: J. Mol. Biol. 8, 105 (1964).
- 33 NEGELEIN, E.: zitiert nach 1.
- 34 NEIDHARDT, F.C. and B. MAGASANIK: BBA 21, 324 (1956).
- 35 NEIDHARDT, F.C. and B. MAGASANIK: J. Bact. 73, 253 (1957).
- 36 CCHOA, S.: J. Biol. Chem. 174, 133 (1948).
- 37 POLAKIS, E.S., W. BARTLEY and G.A. MEEK: Biochem. J. 90, 369 (1964).
- 37a PCNTEFRACHT, R.D. and J.J. MILLER: Canad. J. Microbiol. 8, 573 (1962).
- 38 RACKER, E.: J. Biol. Chem. 184, 313 (1950).
- 39 SLEIN, M.W., G.T. CORI and C.F. CORI: J. Biol. Chem. 186, 763 (1950).
- 40 STADTMAN, E.R.: Methods of Enzymology III, 931, Academic Press Inc., Publishers, New York (1957).
- 41 STOPPANI, A.O.M., A. BENNUN, E.M. DE PAHN: BBA 92, 176 (1964).
- 42 TAVLITZKI, J.: Ann. Inst. Pasteur 76, 497 (1949).

- 43 TUSTANOFF, E. R. and W. BARTLEY: Biochem. J. 91, 595 (1964).
- 44 WEGENER, W. S. and A. H. ROMANO: J. Bact. 87, 156 (1964).
- 45 WITT, I. und H. HOLZER: Biochem. Z. 339, 255 (1964).
- 46 WITT, I., G. KOHLHAW und H. HOLZER: unveröffentliche Versuche.
- 47 WOLFE, R. G. and J. B. NEILANDS: J. Biol. Chem. 221, 61 (1956).

Lebenslauf

Am 29. Juli 1937 wurde ich als drittes von vier Kindern des Lehrers Walter Kronau und seiner Frau Olga, geb. Wietzki, in Altstadt (Oberschles.) geboren.

Nach den Grundschuljahren in Altstadt, Schoningen und Konzen besuchte ich das St. Michael-Gymnasium in Monschau (Eifel). Dort bestand ich im März 1957 die Reifeprüfung. Anschließend wurde ich zum pflichtmäßigen einjährigen Wehrdienst eingezogen.

Danach studierte ich ab Sommersemester 1958 an der Universität zu Köln bis zum zweiten Semester Medizin. Nach dem Vorphysikum setzte ich das Studium bis zum fünften Semester an der Universität in Freiburg im Breisgau fort und legte im November 1960 das Physikum ab.

Nach zwei klinischen Semestern in München und Köln kehrte ich für die letzten vier Semester wieder an die Freiburger Universität zurück, wo ich am 6. November 1963 das medizinische Staatsexamen bestand.

Seit dem 17. November 1963 bin ich am Biochemischen Institut der Universität als Wissenschaftlicher Mitarbeiter beschäftigt. Hier führte ich bis April 1965 die Versuche der vorliegenden Arbeit durch.

